



基于线粒体 COI 基因的中国西南地区木领针蓟马地理种群的遗传分化分析

谢艳兰^{1,2}, 张宏瑞¹, 李正跃^{1,*}

(1. 云南农业大学植物保护学院, 昆明 650201; 2. 滇西科技师范学院, 云南临沧 677000)

摘要:【目的】木领针蓟马 *Helionothrips mube* 近年来成为芋头 *Colocasia esculenta* 上的一种常见害虫。本研究旨在探讨其中国西南地区地理种群间的遗传变异。【方法】通过 Sanger 法测定了 21 个地理种群 132 头木领针蓟马的线粒体 COI 基因序列, 利用 MEGA, DnaSP, Arlequin 和 Network 等软件对木领针蓟马种群间的遗传多样性、遗传分化、分子变异等进行分析。【结果】获得的木领针蓟马 132 条线粒体 COI 序列(643 bp)中共发现 34 个变异位点、16 种单倍型, 其中单倍型 H1 出现频率最高、分布最广。木领针蓟马总群体的遗传多样性较高($Hd=0.712$, $Pi=0.00413$, $K=2.655$), 遗传分化程度极大($Fst=0.3443$), 基因交流水平不高($Nm=0.96$)。分子方差分析(AMOVA)表明, 木领针蓟马的遗传分化主要来自种群内部, Mantel 检测出种群地理距离与遗传距离呈正相关。总群体中性检验 Tajima's D 值显著负值, Fu's Fs 值不显著, 错配分布曲线呈多峰。综合种群间遗传距离、单倍型系统发育树及中介网络图结果, 表明四川成都(ChD)、云南昌宁(ChN)和贵州遵义(ZY)3 个种群的遗传分化程度均高于其他种群。【结论】中国西南地区木领针蓟马总群体的遗传多样性较高, 遗传分化明显, 种群间的基因交流受到地理距离的影响, 总群体在较近的历史时期内没有出现扩张现象。

关键词: 木领针蓟马; 地理种群; 遗传分化; 种群动态; 线粒体 COI 基因

中图分类号: Q963 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2019)03-0370-11

Analysis of genetic differentiation among geographic populations of *Helionothrips mube* (Thysanoptera: Thripidae) in southwestern China based on mitochondrial COI gene

XIE Yan-Lan^{1,2}, ZHANG Hong-Rui¹, LI Zheng-Yue^{1,*} (1. Plant Protection College, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. West Yunnan University, Lincang, Yunnan 677000, China)

Abstract: 【Aim】*Helionothrips mube* has become a common pest on the taro (*Colocasia esculenta*) in recent years. This study aims to investigate the genetic differentiation among different geographic populations of *H. mube* in southwestern China. 【Methods】The mitochondrial COI gene sequences of 132 individuals of *H. mube* from 21 geographic populations were obtained through Sanger sequencing, and the genetic diversity, genetic differentiation and molecular variance were analyzed by MEGA, DnaSP, Arlequin and Network software. 【Results】Thirty-four variable sites were observed and 16 haplotypes were defined based on the 132 mitochondrial COI sequences (643 bp) from 21 geographic populations of *H. mube*, of which H1 had the highest frequency and the widest distribution. High levels of genetic diversity ($Hd=0.712$, $Pi=0.00413$, $K=2.655$) and genetic differentiation ($Fst=0.3443$), and low

基金项目: 国家自然科学基金项目(31860614, 31460574); 云南省中青年学术技术带头人后备人才项目(2015HB036)

作者简介: 谢艳兰, 女, 1988 年 8 月生, 福建龙岩人, 博士研究生, 研究方向为昆虫生态与害虫综合防治, E-mail: xieyanlan@126.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: kmlizhengyue@163.com

收稿日期 Received: 2018-05-07; 接受日期 Accepted: 2018-12-29

gene flow ($Nm = 0.96$) were detected in the total population of *H. mube*. The analysis of molecular variance (AMOVA) indicated that the genetic differentiation of *H. mube* was mainly attributed to the intra-population. The Mantel test showed a positive correlation between the geographic distance and genetic distance. The neutral test showed that Tajima's D value was significantly negative, but Fu's F_s was not significant, and the mismatch distribution curve showed multiple peaks based on the whole datasets. The results of genetic distance among populations, haplotype phylogenetic tree and median-joining network all supported that the population genetic differentiation among the three populations of Chengdu, Sichuan (CHD), Changning, Yunnan (CHN) and Zunyi, Guizhou (ZY) were greater than that among other populations. 【Conclusion】 The *H. mube* populations in southwestern China are characterized by high genetic diversity and obvious genetic differentiation, the gene flow among populations might be affected by geographical distance, and the population of *H. mube* has not experienced recent expansion.

Key words: *Helionothrips mube*; geographic population; genetic differentiation; population dynamics; mitochondrial COI gene

木领针蓟马 *Helionothrips mube* 属于缨翅目 (Thysanoptera) 蓟马科 (Thripidae) 针蓟马亚科 (Panchaetothripinae), 国外分布于日本, 国内分布于陕西、湖南、江西、四川、贵州、云南和台湾等地, 寄主有芋头 *Colocasia esculenta*, 野木瓜属 *Stauntonia* 植物和杂草 (Kudô, 1992; 卢葳等, 2016; Mirab-Balou *et al.*, 2017)。近年来, 木领针蓟马已成为芋头上的一种常见害虫, 是危害芋头的针蓟马优势种, 随着芋头种植面积的扩大, 木领针蓟马对芋头的危害日趋明显。该虫体型微小, 繁殖率高, 成、若虫通常聚集在叶片背面吮吸汁液, 导致叶片产生大面积白色或黄白色斑点; 取食为害的同时分泌球状液滴, 后期液滴变成黑色, 造成污染, 严重影响光合作用, 导致植株衰弱, 影响产量和品质, 降低芋头的经济效益 (卢葳等, 2016)。目前对木领针蓟马的研究主要集中于形态和分类研究 (Kudô, 1992; 冯纪年等, 2007; 卢葳等, 2016; Mirab-Balou *et al.*, 2017), 鲜见利用分子标记技术探讨木领针蓟马种群遗传变异的研究。近年来, 大量分子标记, 例如: 线粒体 (Lyu *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2018)、核糖体 (Fang *et al.*, 2017) 和微卫星 (Cao *et al.*, 2017) 等已被广泛应用于物种的分子鉴定、遗传变异和系统发育等方面研究。其中, 线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 的 COI 基因具有母系遗传特性, 基因重组率低, 很少存在插入和缺失, 有相对较快的进化速率与清晰的进化模式 (Hebert *et al.*, 2003), 已经在鸟类 (Wang *et al.*, 2017)、鱼类 (Negi *et al.*, 2018)、软体动物 (Hu *et al.*, 2018)、爬行动物 (Tonione *et al.*, 2016) 和昆虫 (Dickey *et al.*, 2015; Tyagi *et al.*,

2017) 等动物类群的种、亚种及地理种群之间的系统关系研究中得到了很好的应用。

对昆虫不同地理种群遗传结构和分化的研究有助于探讨其种群间遗传进化关系, 揭示其起源、扩散路线及发生趋势 (Xun *et al.*, 2016)。本研究选用线粒体 COI 基因作为分子标记对木领针蓟马 21 个地理种群的遗传结构及分化进行分析, 探讨其内在的遗传变异和遗传进化关系, 以期为该种害虫的发生扩散规律和防治策略研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

本研究以 21 个地理种群的木领针蓟马作为供试虫源, 寄主植物为芋头 *Colocasia esculenta*。采集方法参考张宏瑞等 (2006) 的直接采集法, 用小毛笔蘸取酒精直接粘取芋头叶上的蓟马, 将其放入盛有 75% 酒精的 1.8 mL 冻存管内, 标明采集时间和地点, 并记录相关生境信息, 带回室内于 -20°C 保存备用。具体样品采集信息详见表 1。

1.2 木领针蓟马基因组 DNA 的提取

本研究参照 Buckman 等 (2013) 和张利娟等 (2011) 的方法, 取单头木领针蓟马, 用无菌微针穿刺蓟马腹部第 3–5 节的节间膜 2~4 次, 使用北京天根公司的 TIANamp Genomic DNA 试剂盒提取基因组 DNA, 提取的 DNA 样品经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 将具有相应条带的样品保存于 -20°C 冰箱中备用。同时, 将提取过 DNA 的蓟马分别单头地及时保存到 75% 的酒精中, 并参照张宏瑞等 (2006) 报道

表 1 木领针蓟马 21 个不同地理种群样本信息
Table 1 Specimen information of 21 different geographic populations of *Helionothrips mube*

种群代码 Population code	采集地点 Collecting locality	样本数 Number of specimens	经纬度 Latitude and longitude	采集时间 Collecting date
ASH	贵州安顺 Anshun, Guizhou	6	26°04'N, 105°45'E	2016-08-28
LB	贵州荔波 Libo, Guizhou	6	25°15'N, 107°42'E	2016-08-27
SD	贵州三都 Sandu, Guizhou	4	25°57'N, 107°57'E	2016-08-24
ZY	贵州遵义 Zunyi, Guizhou	8	28°35'N, 107°15'E	2016-08-27
CHD	四川成都 Chengdu, Sichuan	7	30°59'N, 103°36'E	2016-10-04
GL	广西桂林 Guilin, Guangxi	3	25°06'N, 110°27'E	2015-07-19
CHN	云南昌宁 Changning, Yunnan	4	24°44'N, 99°28'E	2016-08-07
HK	云南河口 Hekou, Yunnan	9	22°31'N, 103°56'E	2015-06-27
JH	云南景洪 Jinghong, Yunnan	4	21°56'N, 101°14'E	2016-08-12
JSH	云南建水 Jianshui, Yunnan	10	23°53'N, 102°53'E	2016-08-08
KM	云南昆明 Kunming, Yunnan	10	25°08'N, 102°44'E	2017-12-25
KY	云南开远 Kaiyuan, Yunnan	10	23°39'N, 103°15'E	2016-08-19
LCH	云南绿春 Lvchun, Yunnan	4	22°59'N, 102°23'E	2012-04-30
LSH	云南泸水 Lushui, Yunnan	7	25°49'N, 98°50'E	2015-08-15
MS	云南芒市 Mangshi, Yunnan	8	24°26'N, 98°35'E	2016-08-16
MZ	云南蒙自 Mengzi, Yunnan	5	23°26'N, 103°21'E	2016-08-10
PB	云南屏边 Pingbian, Yunnan	8	22°55'N, 103°41'E	2016-08-10
PR	云南普洱 Pu'er, Yunnan	5	22°38'N, 99°35'E	2013-04-16
TCH	云南腾冲 Tengchong, Yunnan	4	24°55'N, 98°25'E	2015-06-17
YP	云南永平 Yongping, Yunnan	5	25°28'N, 99°32'E	2016-07-29
YX	云南玉溪 Yuxi, Yunnan	5	24°18'N, 102°44'E	2013-08-27

的方法尽快做成永久玻片标本,玻片标本保存于云南农业大学。

1.3 PCR 扩增及序列测定

使用通用引物 LCO1490: 5'-GGTCAACAAAT CATAAAGATATTGG-3'和 HCO2198: 5'-TAAACTTC AGGGTGACCAAAAAATCA-3'(Folmer *et al.*, 1994)对木领针蓟马 mtDNA COI 基因片段进行 PCR 扩增。扩增反应体系为 30 μL: DNA 模板 5 μL, 2 × TSINGKE Master Mix 15 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL,灭菌双蒸水 8 μL。扩增条件: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 45 s, 共 35 个循环;最后在 72℃充分延伸 10 min, 4℃保存。取 5 μL PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,然后在凝胶成像分析系统中观察并照相,记录结果。确定扩增成功的 PCR 产物委托昆明硕擎生物科技有限公司运用 Sanger 法进行测序。

1.4 序列处理与数据分析

将测序所得正反向序列采用 DNASTAR 7.1 软件包中的 SeqMan 模块将双向序列进行人工拼接和校对编辑,将整理后的序列在 NCBI 网站上进行 BLAST 搜索,以确认扩增的片段是目标基因。利用 MEGA6.06 (Tamura *et al.*, 2013) 软件的 Clustal W 进行多重序列比对,并确定变异位点信息,用 Kimura 2-Parameter (K2P) 模型分别计算地理种群

和单倍型间的遗传距离。

利用 DnaSP 5.10 (Librado and Rozas, 2009) 计算木领针蓟马 21 个种群内 mtDNA COI 序列单倍型数目和出现频率、单倍型多样性 *Hd*、核苷酸多样性 *Pi*、核苷酸平均差异数 *K* 以及种群间核苷酸平均差异数 *Kxy*、核苷酸歧义度 *Dxy* 等遗传系数,并进行错配分布 (mismatch distribution) 分析。应用 Arlequin 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010) 计算种群间遗传分化指数 *Fst*、基因流 *Nm* 及分子方差分析 (AMOVA), 并进行 Fu's *Fs* (Fu, 1997) 和 Tajima's *D* (Tajima, 1989) 中性检验,通过 GenAlEx 6.501 软件进行 Mantel 检验 (Peakall and Smouse, 2012), 计算不同地理种群间遗传距离与地理距离的相关性。单倍型间的系统发育树采用 MEGA6.06 软件,基于 K2P 模型的邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建。使用 Network 5.0 (Bandelt *et al.*, 1999) 软件绘制基于 median-joining 的单倍型中介网络图。

2 结果

2.1 木领针蓟马不同地理种群 mtDNA COI 基因的碱基组成及序列变异

将 21 个种群共 132 条 mtDNA COI 基因序列比对后截齐两端得到 643 bp 的对齐序列,无碱基的插

入和缺失,所测序列中保守位点 609 个,变异位点 34 个,其中简约信息位点 27 个,单一变异位点 7 个,变异位点数占总分析位点数的 5.29%。所测序列中碱基 A, T, G 和 C 的含量分别为 31.2%, 42.2%, 12.8% 和 13.8%; A + T 含量占 73.4%, G + C 含量占 26.6%, 表现较强的 A/T 偏倚。在所有核苷酸替换中,转换(transition)占 92.77%,其中 A 与 G 之间的转换占 24.69%, C 与 T 之间的转换占 68.08%, 颠换(transversion)仅占 7.23%, 总体转换/颠换偏倚率 R 值为 13.66。

2.2 木领针蓟马不同地理种群 mtDNA COI 基因的单倍型和遗传多样性分析

根据 DnaSP 5.10 的分析结果,在木领针蓟马 21 个不同地理种群中共获得 mtDNA COI 基因的 16 个单倍型 H1 – H16 (GenBank 登录号: MH046918 – MH046933), 其中 6 个单倍型 H1, H3, H5, H9, H10 和 H11 为共享单倍型,其余 10 个单倍型为相

应种群的独享单倍型;共享单倍型中 H1 出现频率最高, 占有所有检测个体的 50.0%, 且分布最广, 为 15 个种群共有。

木领针蓟马不同种群 mtDNA COI 基因序列的遗传多样性见表 2, 从各地理种群来看, 贵州遵义 (ZY) 种群的单倍型数量最丰富, 共有 4 个; 贵州安顺 (ASH)、贵州荔波 (LB)、四川成都 (CHD)、云南河口 (HK)、云南泸水 (LSH)、云南蒙自 (MZ) 和云南屏边 (PB) 的单倍型数均为 3 个, 其余种群的单倍型数为 1 ~ 2 个。21 个种群的总群体单倍型多样性 Hd 为 0.712, 核苷酸多样性 Pi 为 0.00413, 核苷酸平均差异数 K 为 2.655。云南蒙自 (MZ) 种群的 Hd 最高, 云南昌宁 (CHN) 种群的 Pi 和 K 值均最高。

比较木领针蓟马不同地理种群间的核苷酸平均差异数 (K_{xy}) 与核苷酸歧义度 (D_{xy}), 结果表明种群间 K_{xy} 的变化在 0.000 ~ 10.714 之间, 平均为 2.792; D_{xy} 值在 0.0000 ~ 0.0167 之间, 平均为 0.0043; 其

表 2 木领针蓟马 21 个不同地理种群 mtDNA COI 基因的遗传多样性分析及中性检验
Table 2 Genetic diversity and neutral test of mtDNA COI gene of *Helionothrips mube* among 21 different geographic populations

种群代码 Population code	单倍型数 Number of haplotypes n	单倍型(个体数) Haplotypes (number of individuals)	单倍型多样性 Haplotype diversity Hd	核苷酸多样性 Nucleotide diversity Pi	核苷酸平均差异数 Average number of nucleotide differences K	中性检验 Tajima's D	中性检验 Fu's F_s
ASH	3	H1(3) H2(2) H3(1)	0.733 ± 0.155	0.00446 ± 0.00102	2.867	0.52043 a	1.720
CHD	3	H4(2) H5(3) H6(2)	0.762 ± 0.115	0.01259 ± 0.00420	8.095	0.92801 a	5.015
CHN	2	H7(3) H8(1)	0.500 ± 0.265	0.01400 ± 0.00742	9.000	-0.85194 a	5.389
GL	1	H10(3)	0	0	0	-	-
HK	3	H1(3) H9(4) H11(2)	0.722 ± 0.097	0.00320 ± 0.00047	2.056	1.61236 a	1.855
JH	2	H1(3) H5(1)	0.500 ± 0.265	0.00078 ± 0.00041	0.500	-0.61237 a	0.172
JSH	2	H1(9) H5(1)	0.200 ± 0.154	0.00031 ± 0.00024	0.200	-1.11173 a	-0.339
KM	1	H1(10)	0	0	0	-	-
KY	1	H1(10)	0	0	0	-	-
LB	3	H10(4) H3(1) H12(1)	0.600 ± 0.215	0.00104 ± 0.00043	0.667	-1.13197 a	-0.858
LCH	1	H1(4)	0	0	0	-	-
LSH	3	H1(2) H9(4) H13(1)	0.667 ± 0.160	0.00311 ± 0.00070	2.000	1.07560 a	1.321
MSH	2	H1(2) H9(6)	0.429 ± 0.169	0.00200 ± 0.00079	1.286	0.45766 a	2.469
MZ	3	H1(1) H9(2) H11(2)	0.800 ± 0.164	0.00373 ± 0.00090	2.400	1.64070 a	0.952
PB	3	H1(4) H9(2) H11(2)	0.714 ± 0.123	0.00267 ± 0.00076	1.714	-0.61237 a	1.243
PR	1	H1(5)	0	0	0	-	-
SD	1	H10(4)	0	0	0	-	-
TCH	1	H1(4)	0	0	0	-	-
YP	2	H1(2) H9(3)	0.600 ± 0.175	0.00280 ± 0.00082	1.800	1.57274 a	2.429
YX	2	H1(4) H14(1)	0.400 ± 0.237	0.00062 ± 0.00037	0.400	-0.81650 a	0.090
ZY	4	H3(3) H10(3) H15(1) H16(1)	0.786 ± 0.113	0.00850 ± 0.00518	5.464	-1.51811 b	2.428
总群体 Total	16	H1 – H16	0.712 ± 0.037	0.00413 ± 0.00068	2.655	-1.75707 b	-2.808

H1 – H16: 分别为木领针蓟马的 16 个单倍型 16 haplotypes of *H. mube*, respectively. 种群代码信息见表 1。多样性数值为平均值 ± 标准差; 同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($0.01 < P < 0.05$, 多重检验)。For population code information, see Table 1. The values of diversity were represented as mean ± SD . Different lowercase following the data in a column indicate significant difference ($0.01 < P < 0.05$, multiple test).

中,四川成都(CHD)、云南昌宁(CHN)和贵州遵义(ZY) 3 个种群分别与其他种群的 K_{xy} 和 D_{xy} 差异较大,说明此 3 个种群遗传多样性相对较高。

2.3 木领针蓟马不同地理种群的遗传分化和种群动态分析

2.3.1 遗传分化分析:遗传距离的计算结果表明,木领针蓟马 mtDNA COI 基因 16 个单倍型间的遗传距离为 0.0016 ~ 0.0353 (表 3),平均为 0.0130,其中 H4, H8 和 H16 与其他单倍型间的遗传距离都大于 0.0238,达到较高水平。木领针蓟马 21 个地理种群间的遗传距离在 0.0000 ~ 0.0170 之间(表 4),平均为 0.0044,其中四川成都(CHD)、云南昌宁(CHN)和贵州遵义(ZY)种群与其他地理种群间的

遗传距离较大,均超过 0.0046。

分子方差分析(AMOVA)结果表明(表 5),种群内遗传变异百分率为 67.74%,种群间遗传变异百分率为 32.26%,种群内变异显著大于种群间变异($P < 0.001$)。木领针蓟马总群体遗传分化指数(F_{st})为 0.3443,基因流(N_m)为 0.960,各地理种群间的 F_{st} 在 $-0.1898 \sim 1.0000$ 之间, N_m 从 0 到无限大(∞)(表 6)。

根据经纬度计算各采样地点的地理距离,并计算其自然对数。通过 GenAlEx 6.501 对地理距离对数和遗传距离进行 Mantel 相关性检测(图 1),结果显示 21 个种群地理距离与遗传分化程度存在显著正相关,相关系数 $r = 0.282$ ($P = 0.018 < 0.05$)。

表 3 木领针蓟马 mtDNA COI 基因 16 个不同单倍型间的遗传距离
Table 3 Genetic distance among 16 different haplotypes of mtDNA COI gene of *Helionothrips mube*

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16
H1																
H2	0.0063															
H3	0.0047	0.0078														
H4	0.0238	0.0304	0.0271													
H5	0.0016	0.0078	0.0063	0.0254												
H6	0.0031	0.0094	0.0078	0.0271	0.0016											
H7	0.0078	0.0110	0.0063	0.0271	0.0094	0.0110										
H8	0.0271	0.0304	0.0288	0.0078	0.0287	0.0304	0.0287									
H9	0.0047	0.0078	0.0031	0.0239	0.0063	0.0078	0.0031	0.0255								
H10	0.0031	0.0063	0.0016	0.0255	0.0047	0.0063	0.0047	0.0271	0.0016							
H11	0.0016	0.0078	0.0063	0.0254	0.0031	0.0047	0.0094	0.0287	0.0063	0.0047						
H12	0.0047	0.0078	0.0031	0.0271	0.0063	0.0078	0.0063	0.0288	0.0031	0.0016	0.0063					
H13	0.0016	0.0078	0.0063	0.0254	0.0031	0.0047	0.0094	0.0287	0.0063	0.0047	0.0031	0.0063				
H14	0.0016	0.0078	0.0063	0.0254	0.0031	0.0047	0.0094	0.0287	0.0063	0.0047	0.0031	0.0063	0.0031			
H15	0.0031	0.0063	0.0031	0.0239	0.0047	0.0063	0.0063	0.0288	0.0031	0.0016	0.0047	0.0031	0.0047	0.0047		
H16	0.0287	0.0353	0.0321	0.0142	0.0304	0.0320	0.0320	0.0126	0.0288	0.0304	0.0304	0.0321	0.0304	0.0304	0.0288	

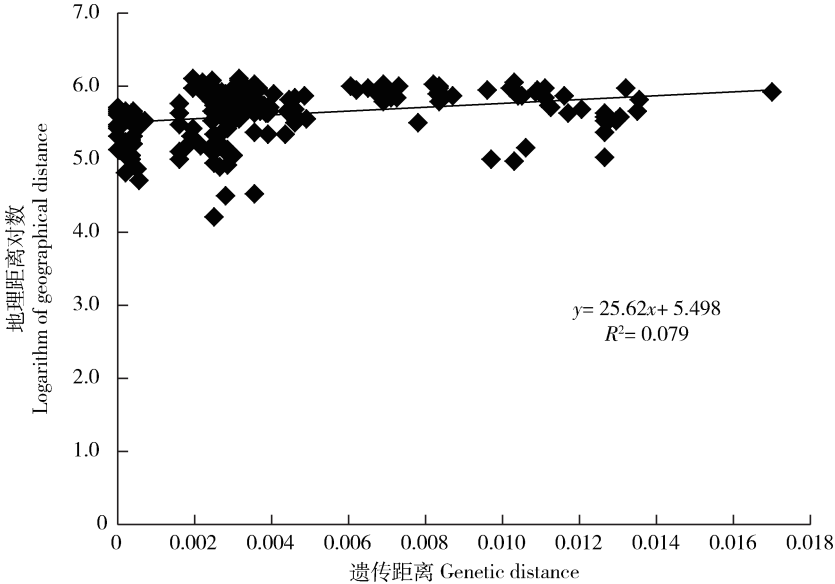


图 1 木领针蓟马 21 个不同地理种群遗传距离与地理距离自然对数的 Mantel 检验

Fig. 1 Mantel test between genetic distance and logarithm of geographical distance among 21 populations of *Helionothrips mube*

表 4 木领针蓟马 21 个不同地理种群间的遗传距离

Table 4 Genetic distance among 21 different geographic populations of *Helionothrips mube*

	ASH	CHD	CHN	GL	HK	JH	JSH	KM	KY	LB	LCH	LSH	MSH	MZ	PB	PR	SD	TCH	YP	YX	ZY
ASH																					
CHD	0.0112																				
CHN	0.0136	0.0170																			
GL	0.0048	0.0109	0.0097																		
HK	0.0039	0.0111	0.0103	0.0019																	
JH	0.0044	0.0102	0.0112	0.0028	0.0028																
JSH	0.0030	0.0083	0.0128	0.0037	0.0033	0.0026															
KM	0.0029	0.0084	0.0126	0.0035	0.0031	0.0024	0.0002														
KY	0.0029	0.0084	0.0126	0.0035	0.0031	0.0024	0.0002	0.0000													
LB	0.0043	0.0116	0.0108	0.0025	0.0005	0.0033	0.0038	0.0036	0.0036												
LCH	0.0029	0.0084	0.0126	0.0035	0.0031	0.0024	0.0002	0.0000	0.0000	0.0036											
LSH	0.0046	0.0105	0.0106	0.0024	0.0024	0.0029	0.0031	0.0029	0.0029	0.0030	0.0029										
MSH	0.0045	0.0103	0.0117	0.0032	0.0031	0.0030	0.0027	0.0025	0.0025	0.0036	0.0025	0.0033									
MZ	0.0039	0.0096	0.0121	0.0033	0.0031	0.0028	0.0017	0.0016	0.0016	0.0036	0.0016	0.0031	0.0028								
PB	0.0029	0.0084	0.0126	0.0035	0.0031	0.0024	0.0002	0.0000	0.0000	0.0036	0.0000	0.0029	0.0025	0.0016							
PR	0.0039	0.0111	0.0103	0.0019	0.0000	0.0028	0.0033	0.0031	0.0031	0.0005	0.0031	0.0024	0.0031	0.0031	0.0031						
SD	0.0029	0.0084	0.0126	0.0035	0.0031	0.0024	0.0002	0.0000	0.0000	0.0036	0.0000	0.0029	0.0025	0.0016	0.0000	0.0031					
TCH	0.0033	0.0082	0.0130	0.0039	0.0035	0.0028	0.0005	0.0004	0.0004	0.0040	0.0004	0.0033	0.0029	0.0020	0.0004	0.0035	0.0004				
YP	0.0044	0.0104	0.0103	0.0021	0.0022	0.0027	0.0030	0.0028	0.0028	0.0027	0.0028	0.0025	0.0031	0.0030	0.0028	0.0022	0.0028	0.0032			
YX	0.0032	0.0087	0.0130	0.0038	0.0034	0.0027	0.0005	0.0003	0.0003	0.0040	0.0003	0.0032	0.0028	0.0019	0.0003	0.0034	0.0003	0.0007	0.0031		
ZY	0.0078	0.0135	0.0132	0.0060	0.0046	0.0067	0.0071	0.0069	0.0069	0.0049	0.0069	0.0065	0.0071	0.0070	0.0069	0.0046	0.0069	0.0073	0.0062	0.0072	

种群代码信息见表 1。For population code information, see Table 1.

表 5 木领针蓟马 21 个种群间遗传变异的分子方差分析
Table 5 Analysis of molecular variance (AMOVA) of genetic variance among 21 populations of *Helionothrips mube*

变异来源 Source of variation	自由度 <i>d. f.</i>	平方和 Sum of squares	方差组分 Variance components	变异百分率 Percentage of variation
种群间 Among populations	20	72.563	0.43467 <i>Va</i>	32.26
种群内 Within a population	111	101.316	0.91276 <i>Vb</i>	67.74
总变异 Total variance	131	173.879	1.34743	

Va, *Vb*: 方差组分的数量 Number of variance components.

2.3.2 种群动态分析:从中性检验的 Tajima's *D* 值可以看出(表 2), 贵州遵义(ZY)种群与总群体的差异达到显著水平($P < 0.05$), 其余地理种群均不显著($P > 0.05$); 而 Fu's *F_s* 的检验值无论总群体还是不同地理种群都不显著($P > 0.05$), 表明在较近的历史时期种群较为稳定, 未经历明显的种群扩张。一般认为, 与 Tajima's *D* 相比, Fu's *F_s* 能更好地检测种群扩张现象(Fu, 1997; Ramos-Onsins and Rozas, 2002), 当 Fu's *F_s* 检验值不显著而 Tajima's *D* 检验值为负值时, 表明符合自然选择理论。

错配分布(mismatch distribution)可以体现群体发展历史动态, 当一个种群为最近形成或扩张种群时, 其错配分布曲线呈现单峰; 而当一个种群为存在时间较长且稳定的种群时, 错配分布曲线则呈现多峰(Harpending *et al.*, 1998)。本研究结果显示(图 2), 木领针蓟马总群体错配分布曲线出现多峰, 表明种群较稳定, 近期历史未经历明显扩张, 与 Fu's *F_s* 检验结果一致。

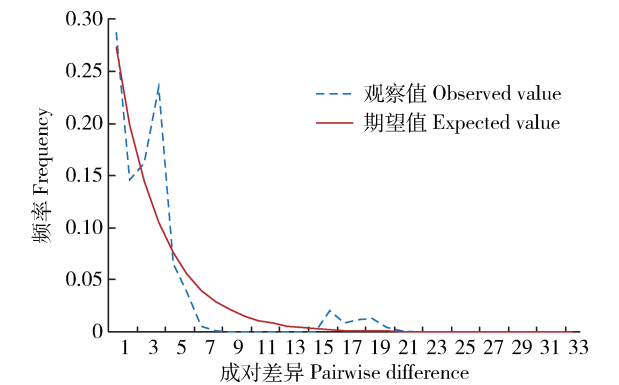


图 2 基于 mtDNA COI 基因的 21 个木领针蓟马种群错配分布分析
Fig. 2 Mismatch distribution analysis of 21 populations of *Helionothrips mube* based on mtDNA COI gene

2.4 木领针蓟马 mtDNA COI 基因单倍型的系统发育分析

以巢针属蓟马 *Caliothrips fasciatus* 的 mtDNA

COI 序列(CenBank 登录号: JQ609565.1)作为外群, 基于 K2P 模型的邻接法构建木领针蓟马 COI 序列 16 个单倍型的系统发育树(图 3)。可以看出, 16 个单倍型形成 3 个明显的分支, 其中 H4, H8 和 H16 聚为一支, 为基部分支; 其他 7 种单倍型和 6 种单倍型又分别聚为支系 1 和支系 2 两大分支。

利用单倍型中介网络图能够更直观看出各单倍型之间的演化关系以及在不同地理种群的分布情况, 由图 4 可以看出, 单倍型形成明显的 3 个支系, 与系统发育树结果吻合; 支系 3 中 H4, H8 和 H16 这 3 个单倍型分别为四川成都(CHD)、云南昌宁(CHN)和贵州遵义(ZY)种群独享; 6 个共享单倍型(H1, H3, H5, H9, H10 和 H11)相互散布在不同的地理种群中。

3 讨论

本研究获得木领针蓟马 132 条 mtDNA COI 基因序列, 碱基组成表现较强的 A/T 偏倚性, 与典型的昆虫线粒体碱基组成特点一致(Jermin and Crozier, 1994)。所有木领针蓟马 132 条 mtDNA COI 序列的核苷酸替换中, 总体转换/颠换偏倚率 *R* 值为 13.66, 这一结果符合 Simon 等(1994)报道的关于亲缘关系相近的分类阶元中核苷酸转换大于颠换, 而在较为远缘的分类阶元间则相反的规律这一特征。

本研究所测序列共定义了 16 个单倍型, 其中有 6 个共享单倍型和 10 个独享单倍型, 说明各地理种群有一定基因交流的同时, 也具有一定程度的遗传分化。共享单倍型 H1 发生频率最高、分布最广, 可认为是较为原始、能够适应环境变化并在种群中稳定存在的优势单倍型。总群体的单倍型多样性指数较高(*H_d* = 0.712), 表明木领针蓟马 mtDNA COI 基因具有较高的多态性, 一定程度上反映了其较强的适应能力和较高的遗传变异潜力。

表 6 木领针蓟马 21 个不同地理种群间的遗传分化指数 (F_{st}) (下三角) 与基因流 (N_m) (上三角)

Table 6 Population pairwise F_{st} values (below diagonal) and gene flow N_m values (above diagonal) among 21 different populations of <i>Helionothrips mube</i>																				
ASH	CHD	CHN	GL	HK	JH	JSH	KM	KY	LB	LCH	LSH	MSH	MZ	PB	PR	SD	TCH	YP	YX	ZY
ASH	1.878	0.879	1.290	3.293	3.423	1.163	1.019	1.019	0.874	3.373	2.363	0.932	5.153	4.658	2.295	0.961	3.373	2.491	2.498	3.164
CHD		1.891	1.456	1.561	6.486	1.316	1.138	1.138	0.826	3.568	1.572	0.976	2.606	1.897	2.469	1.092	3.568	1.956	2.518	1.894
CHN			1.742	0.936	0.679	0.285	0.266	0.266	0.793	0.643	1.328	1.190	1.384	0.704	0.513	1.125	0.643	1.871	0.545	2.465
GL				1.649	0.076	0.041	0.000	0.000	inf	0.000	2.100	1.091	1.304	0.706	0.000	inf	0.000	1.667	0.068	inf
HK					1.990	0.996	0.896	0.896	1.074	2.009	inf	6.564	inf	inf	1.598	1.258	2.009	inf	1.678	3.445
JH						1.127	1.538	1.538	0.152	inf	0.977	0.338	2.293	11.368	7.500	0.063	inf	0.720	77.500	1.527
JSH							inf	inf	0.091	inf	0.512	0.208	0.846	2.646	inf	0.038	inf	0.351	12.143	0.731
KM								inf	0.059	inf	0.443	0.173	0.698	2.264	inf	0.000	inf	0.278	2.857	0.697
KY									0.059	inf	0.443	0.173	0.698	2.264	inf	0.000	inf	0.278	2.857	0.697
LB										0.106	1.258	0.866	0.864	0.571	0.093	inf	0.106	1.123	0.137	inf
LCH											0.903	0.296	2.069	24.000	inf	0.000	inf	0.606	inf	1.509
LSH												inf	inf	6.340	0.755	1.474	0.903	inf	0.843	5.968
MSH															1.200	0.263	0.867	inf	0.307	3.857
MZ																1.500	0.938	inf	1.750	5.210
PB																	24.000	5.963	6.939	2.116
PR																		inf	inf	1.225
SD																			0.500	inf
TCH																				inf
YP																				1.509
YX																				14.452
ZY																				1.262

种群代码信息见表 1。For population code information, see Table 1. Inf: 无限大 Infinite.

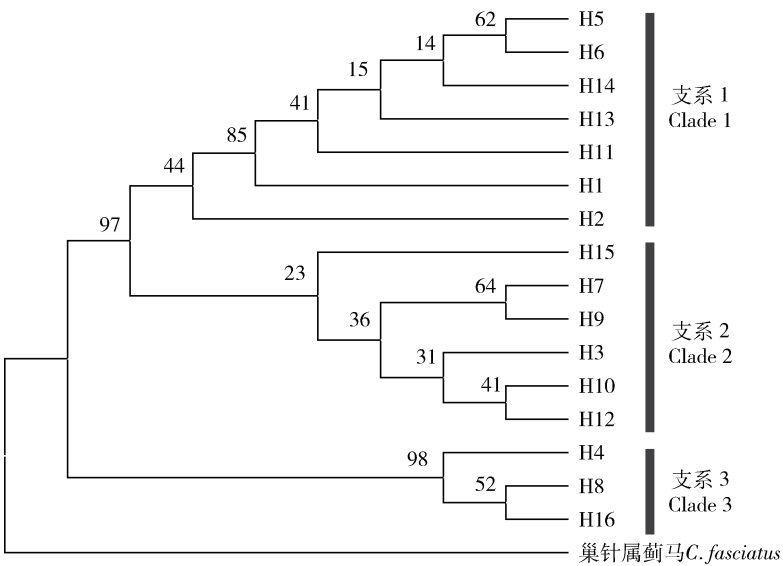


图3 木领针蓟马 mtDNA COI 基因的 16 个单倍型系统发育树(邻接法)

Fig. 3 Phylogenetic tree of 16 haplotypes of *Helionothrips mube* based on mtDNA COI gene (neighbor-joining method)
H1 – H16: 分别为木领针蓟马的 16 个单倍型 16 haplotypes of *H. mube*, respectively. 各分支节点上的数字为经过 1 000 次计算后的置信度值。
Numbers above the branches are the bootstrap values calculated with 1 000 replications.

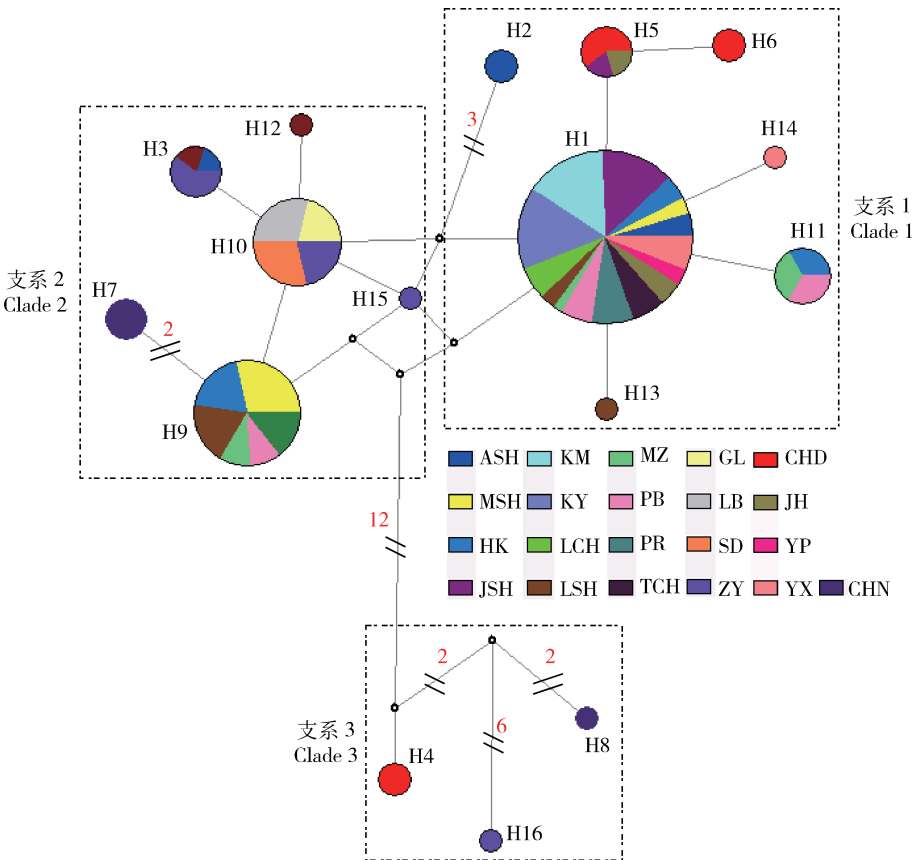


图4 木领针蓟马 21 个不同地理种群 mtDNA COI 基因的单倍型中介网络图

Fig. 4 Median-joining haplotype network of 21 different geographic populations of *Helionothrips mube* based on mtDNA COI gene
种群代码信息见表 1。一个圆圈表示一个单倍型,圆圈大小与单倍型频率成正比,21 种颜色代表 21 个采样地点;黑色小圆圈代表缺失的中间单倍型;连接线上的红色数值表示单倍型之间超过 1 步的突变步数。For population code information, see Table 1. Each haplotype is represented by a circle, with the size indicating the haplotype frequencies, and the 21 colors indicating the 21 sampling locations. Small black circle represents missing intermediate haplotype. The mutation steps more than one between haplotypes were marked on the connecting line.

Fst 可以反映种群间遗传分化程度, 其值在 $-1 \sim 1$ 之间, *Fst* 值越大表示两个群体的分化程度越高 (Hudson *et al.*, 1992)。本研究所有成对的 *Fst* 值中, 有 51.9% 的 *Fst* > 0.25 , 表明两种种群间高度的遗传分化, 而只有 20.0% 的 *Fst* < 0.05 , 说明种群间无遗传分化 (Wright, 1978)。总群体基因交流水平不高 ($Nm = 0.960 < 1$), 可能由于遗传漂变而发生了分化 (Boivin *et al.*, 2004)。Mantel 检验表明, 随着地理距离的增加, 木领针蓟马不同种群间基因交流减少, 遗传距离增大。分子方差分析 (AMOVA) 的结果也验证了遗传变异主要来自种群内部。中性检验及错配分布分析表明 21 个地理种群在较近的历史时期内未经历快速扩张, 种群大小处于相对稳定的状态, 近几年观察到木领针蓟马在芋头上危害日益严重的情况, 可能是当地种群积累的结果。

从单倍型系统发育树和中介网络图可以看出, 16 个单倍型没有按照地理分布形成明显的地理族群, 各地理种群具有的单倍型处于相互散布的、比较混杂的分布格局中。值得注意的是, 分别被四川成都 (CHD)、云南昌宁 (CHN) 和贵州遵义 (ZY) 种群独享的 3 个单倍型 H4, H8 和 H16 与其他的单倍型有明显分支。从地理距离来看, CHD, CHN 和 ZY 这 3 个地理位置分别在本研究的 21 个采样点的边缘区, 推测地理隔离是造成这 3 个地理种群产生较大遗传分化的主要因素。木领针蓟马体型微小, 成虫飞行能力较弱, 远距离传播主要靠寄主植物的运输, 但芋头在市场中交易的主体是块茎, 而不是木领针蓟马取食和产卵的芋叶, 因此由远距离传播产生的基因交流是有限的。Tuda 等 (2014) 认为, 对非迁飞性的植食性昆虫来说, 寄主植物的品种和生长条件也是影响种群分化的重要因素。我国芋头种质资源丰富, 芋头种下分为叶用芋变种 *var. petiolatus*、球茎用芋变种 *var. cormosus* 和花茎用芋变种 *var. inflorescens* 3 个变种, 变种下又分为 7 个不同的变型和副型 (李庆典等, 2004)。据记载, 在云南西双版纳勐宋的哈尼族和基诺山的基诺族中, 平均每户种植 5~6 个不同的芋品种, 从事旱地农业的地区, 一般每户种植的芋品种也有 2~3 个 (普迎冬等, 1999)。在本研究中 21 个种群的采集过程中极有可能涉及到寄主不同变种和变型, 且寄主的生长环境多样, 有水田、低洼地和旱地等。作者据此认为, 地理隔离和寄主植物的品种多样性可能是影响木领针蓟马种群发生遗传变异的两个重要因素。

本研究仅以 mtDNA COI 单个基因片段作为分

子标记进行检测, 采集地也局限在云南、贵州、四川和广西几个地区, 且个别地区样本数量较少, 在遗传多样性和遗传分化上的解释可能会出现偏差。关于木领针蓟马种群的遗传变异和地理种群分化格局的更深层原因, 需要扩大采样范围和样本数量, 同时结合更多的分子标记进行系统深入研究。

致谢 感谢中国农业科学院棉花所张利娟博士在数据分析上给予的帮助; 感谢本实验室卢葳和李亚金在标本采集和鉴定等前期工作中的帮助。

参考文献 (References)

- Bandelt HJ, Forster P, Rohl A, 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, 16(1): 37–48.
- Boivin T, Bouvier JC, Beslay D, Suphanor B, 2004. Variability in diapause propensity within populations of a temperate insect species: interactions between insecticide resistance genes and photoperiodism. *Biol. J. Linn. Soc.*, 83(3): 341–351.
- Buckman RS, Mound LA, Whiting MF, 2013. Phylogeny of thrips (Insecta: Thysanoptera) based on five molecular loci. *Syst. Entomol.*, 38(1): 123–133.
- Cao LJ, Wang ZH, Gong YJ, Zhu L, Hoffmann AA, Wei SJ, 2017. Low genetic diversity but strong population structure reflects multiple introductions of western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) into China followed by human-mediated spread. *Evol. Appl.*, 10(4): 391–401.
- Dickey AM, Kumar V, Hoddle MS, Funderburk JE, Morgan JK, Jara-Cavieses A, Shatters GJ, Osborne LS, McKenzie CL, 2015. The *Scirtothrips dorsalis* species complex: endemism and invasion in a global pest. *PLoS ONE*, 10(4): e0123747.
- Excoffier L, Lischer HEL, 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Res.*, 10: 564–567.
- Fang Y, Shi WQ, Zhang Y, 2017. Molecular phylogeny of *Anopheles hyrcanus* group members based on ITS2 rDNA. *Parasit. Vectors*, 10: 417.
- Feng JN, Yang XN, Zhang GL, 2007. Taxonomic study of the genus *Heliothrips* from China (Thysanoptera, Thripidae). *Acta Zool. Sin.*, 32(2): 451–454. [冯纪年, 杨晓娜, 张桂玲, 2007. 领针蓟马属的分类研究. 动物分类学报, 32(2): 451–454]
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3(5): 294–299.
- Fu YX, 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915–925.
- Harpending HC, Batzer MA, Gurven M, Jorde LB, Rogers AR, Sherry ST, 1998. Genetic traces of ancient demography. *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA, 95(4): 1961–1967.

Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 270 (1512): 313–321.

Hu L, Zhang Z, Wang H, Zhang T, 2018. Molecular phylogeography and population history of *Crassostrea sikamea* (Amemiya, 1928) based on mitochondrial DNA. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 503: 23–30.

Hudson RR, Slatkin M, Maddison WP, 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, 132: 583–589.

Jermiin LS, Crozier RH, 1994. The cytochrome *b* region in the mitochondrial DNA of the ant *Tetraponera rufoniger*; sequence divergence in Hymenoptera may be associated with nucleotide content. *J. Mol. Evol.*, 38(3): 282–294.

Kudô I, 1992. Panchaetothripinae in Japan (Thysanoptera, Thripidae) 2. Panchaetothripini, the genus *Helionothrips*. *Jpn. J. Entomol.*, 60(2): 271–289.

Li QD, Yang YP, Li Y, Zhou QM, 2004. Studies on genetic diversity and taxonomy of taro in China. *J. Hunan Agric. Univ. (Nat. Sci.)*, 30(5): 424–428. [李庆典, 杨永平, 李颖, 周清明, 2004. 中国芋种质资源的遗传多样性及分类研究. 湖南农业大学学报 (自然科学版), 30(5): 424–428]

Librado P, Rozas J, 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(1): 1451–1452.

Lu W, Zhang HR, Li ZY, Lu XX, 2016. Recognition of *Helionothrips* and its damage to taro. *J. South. Agric.*, 47(5): 667–671. [卢葳, 张宏瑞, 李正跃, 陆星星, 2016. 领针蓟马 (*Helionothrips*) 识别及其对芋头的危害. 南方农业学报, 47(5): 667–671]

Lyu Z, Zhi J, Zhou Y, Meng Z, Yue W, 2016. Genetic diversity and origin of *Dendrothrips minowai* (Thysanoptera: Thripidae) in Guizhou, China. *J. Asia Pac. Entomol.*, 19(4): 1035–1042.

Mirab-Balou M, Wang Z, Tong X, 2017. Review of the Panchaetothripinae (Thysanoptera: Thripidae) of China, with two new species descriptions. *Can. Entomol.*, 149(2): 141–158.

Negi RK, Joshi BD, Johnson JA, De R, Goyal SP, 2018. Phylogeography of freshwater fish *Puntius sophore* in India. *Mitochondrial DNA Part A DNA Mapp. Seq. Anal.*, 29(2): 256–265.

Peakall R, Smouse PE, 2012. GENALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*, 28(19): 2537–2539.

Pu YD, Yang YP, Xu JC, Qian J, 1999. Germplasm resource and its utilization of taro in Yunnan. *China Seeds*, (1): 1–4. [普迎冬, 杨永平, 许建初, 钱洁, 1999. 云南芋头种质资源及利用. 作物品种资源, (1): 1–4]

Ramos-Onsins SE, Rozas J, 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol. Biol. Evol.*, 19: 2092–2100.

Simon C, Frati F, Beckenbach AT, Crespi B, Liu H, Flook P, 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 87(6): 651–701.

Tajima F, 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3): 585–595.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S, 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 30(12): 2725–2729.

Tonione MA, Fisher RN, Zhu C, Moritz C, 2016. Deep divergence and structure in the Tropical Oceanic Pacific: a multilocus phylogeography of a widespread gekkonid lizard (Squamata: Gekkonidae: *Gehyra oceanica*). *J. Biol.*, 43(2): 268–278.

Tuda M, Kagoshima K, Toquenaga Y, Arnqvist G, 2014. Global genetic differentiation in a cosmopolitan pest of stored beans: effects of geography, host-plant usage and anthropogenic factors. *PLoS ONE*, 9(9): e106268.

Tyagi K, Kumar V, Singha D, Chandra K, Laskar BA, Kundu S, Chakraborty R, Chatterjee S, 2017. DNA barcoding studies on thrips in India: cryptic species and species complexes. *Sci. Rep.*, 7(1): 4898.

Wang E, Van Wijk RE, Braun MS, Wink M, 2017. Gene flow and genetic drift contribute to high genetic diversity with low phylogeographical structure in European hoopoes (*Upupa epops*). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 113: 113–125.

Wright S, 1978. Evolution and the Genetics of Populations, Vol. 4. University of Chicago Press, Chicago and London. 79–103.

Xun H, Li H, Li S, Wei S, Zhang L, Song F, Jiang P, Yang H, Han F, Cai W, 2016. Population genetic structure and post-LGM expansion of the plant bug *Nesidiocoris tenuis* (Hemiptera: Miridae) in China. *Sci. Rep.*, 6: 26755.

Zhang HR, Okajima S, Mound LA, 2006. Collecting and slide preparation methods of thrips. *Chin. Bull. Entomol.*, 43(5): 725–728. [张宏瑞, Okajima S, Mound LA, 2006. 蓟马采集和玻片标本的制作. 昆虫知识, 43(5): 725–728]

Zhang LJ, Shen DR, Zhang HR, Zhang HW, Li ZY, 2011. Method improvement for extraction genomic DNA from thrips. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 48(3): 775–781. [张利娟, 沈登荣, 张宏瑞, 张宏伟, 李正跃, 2011. 蓟马基因组 DNA 提取方法的改进. 应用昆虫学报, 48(3): 775–781]

Zheng S, Li Y, Yang X, Chen J, Hua J, Gao Y, 2018. DNA barcoding identification of Pseudococcidae (Hemiptera: Coccoidea) using the mitochondrial COI gene. *Mitochondrial DNA Part B*, 3(1): 419–423.

(责任编辑: 马丽萍)